

8  
PCT/JP97/00687

05.02.97

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 13 MAY 1997

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1996年 3月 5日

出 願 番 号

Application Number:

平成 8年特許願第047796号

出 願 人

Applicant(s):

株式会社ディナバック研究所

PRIORITY DOCUMENT

1997年 4月25日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光

出証番号 出証特平09-3029819

【書類名】 特許願

【整理番号】 D3-803

【提出日】 平成 8年 3月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/62

【発明の名称】 選択的増殖性を付与する遺伝子

【請求項の数】 17

【発明者】

    【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町祇園 3-1-3-C201

    【氏名】 小澤 敬也

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社デ  
        ィナベック研究所内

    【氏名】 坂田 恒昭

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社デ  
        ィナベック研究所内

    【氏名】 伊藤 克久

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 株式会社デ  
        ィナベック研究所内

    【氏名】 長谷川 護

【特許出願人】

    【識別番号】 595155107

    【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

    【代表者】 中富 博隆

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

特平 8-047796

【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 選択的増殖性を付与する遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、を含む融合タンパク質。

【請求項2】 「サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」が、G-CSF受容体に由来する、請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項3】 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、請求項1記載の融合タンパク質。

【請求項4】 ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である、請求項3記載の融合タンパク質。

【請求項5】 請求項1記載の融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター。

【請求項6】 請求項5に記載のベクターを保持する細胞。

【請求項7】 請求項6に記載の細胞に対して、請求項1記載の融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、請求項6に記載の細胞を選択的に増殖させる方法。

【請求項8】 (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) 会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質をコードする遺伝子と所望の外来遺伝子、を含むベクター。

【請求項9】 「会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」がサイトカイン受容体に由来する、請求項8記載のベクター。

【請求項10】 サイトカイン受容体がG-CSF受容体である請求項9記載のベクター。

【請求項11】 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、請求項8記載のベクター。

【請求項12】 ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である請求項1記載のベクター。

【請求項13】 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが同一の分子上に位置している請求項8記載のベクター。

【請求項14】 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが別々の分子上に位置している請求項8記載のベクター。

【請求項15】 請求項8～14のいずれかに記載のベクターを保持する細胞。

【請求項16】 請求項15に記載の細胞に対して、請求項8記載のベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、請求項15に記載の細胞を選択的に増殖させる方法。

【請求項17】 (a) 請求項5または8に記載のベクター、及び(b) 該ベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンド、を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学分野、特に遺伝子治療の分野に関する。

【0002】

【従来技術】

先天的又は後天的に遺伝子に欠陥があるために発症する病気、即ち、遺伝子疾患に対しては、これまで様々な治療法が考えられてきた。その一つとして、欠陥遺伝子そのものを正常な遺伝子と入れ換えたり、正常な遺伝子を補ったりすることにより、遺伝子疾患を根本的に解決しようとするのが、遺伝子治療である。この遺伝子治療に当たって重要なことは、正常な遺伝子を標的細胞に正確に導入すると共に、導入した遺伝子を正確に発現させることである。正常な遺伝子を標的細胞に導入するための遺伝子のベクターとしては、これまで、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター等のウイルスベ

クターや、リボソーム等に代表される非ウイルスベクターが用いられてきた。しかし、いずれも標的細胞への遺伝子の導入効率が低い等の欠点が存在した。また、導入された遺伝子の発現効率が悪い等の欠点もあったため治療に不十分な場合が多かった。この場合でも、アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症のように、正常ADA遺伝子が導入された細胞が生存優位性（survival advantage）あるいは増殖優位性（growth advantage）を獲得し、体内で次第に選択され優位になっていくものと期待されるものであれば、たとえ遺伝子導入効率が低くても次第に治療効果が現れるようになっていく可能性がある。しかし、このような体内での選択性が期待できないタイプの治療用遺伝子を導入する必要のある場合も多く、遺伝子を導入した細胞を選択的に増幅させるシステムの確立が望まれていた。

## 【0003】

ところで、G-CSFは、好中球を選択的に増殖させるサイトカイン（造血因子）として従来から考えられてきたが、近年、G-CSFを投与すると、好中球の増加がみられるばかりでなく、造血幹細胞／前駆細胞の体内プールの増加がみられることが報告された（臨床血液.,35,1080(1994)）。また、G-CSFが機能する機構として、G-CSF刺激によりG-CSF受容体が活性化されるときには、G-CSF受容体の二量体化がみられること（Proc Growth Factor Res.,3(2),131-141(1991)）や、G-CSF受容体には、増殖誘導ドメインと分化誘導ドメインが存在することが報告された（Cell.,74,1079-1087(1993)）。さらに、G-CSF受容体同様、二量体化により活性化する受容体としては、エストロゲン受容体が知られており（J Biol Chem.,264,2397-2400(1989)）、細胞内でエストロゲン受容体とc-Ablチロシンキナーゼの融合タンパク質を発現させることによりc-Ablチロシンキナーゼの活性化が起こることも報告された（The EMBO Journal.,12,2809-2819(1993)）。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】：

本発明は、治療用遺伝子を導入した造血幹細胞等を体内あるいは体外で選択的に増幅させることにより、遺伝子導入効率が低いという問題点を克服することを狙ったもので、造血幹細胞等を標的とした遺伝子治療の基盤技術を提供することを目的とする。

【0005】

現在、遺伝子治療の分野においては、標的細胞への遺伝子の導入効率及び導入された遺伝子の発現効率の面で克服すべき課題が多い。従って、遺伝子導入がなされた標的細胞のみを選択的に増殖させるシステムが確立されれば、大きな飛躍がもたらされることは、明らかである。特に、赤血球、白血球など多くの血液細胞の基となる細胞であり、遺伝子治療の標的細胞として最も好ましいとされる造血幹細胞に対し、かかるシステムが確立されれば、遺伝子治療の分野における貢献度は、非常に大きい。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、好中球を選択的に増殖させるサイトカイン（造血因子）として従来から考えられてきたG-CSFが、造血幹細胞の増殖をも引き起こし、このG-CSF受容体が活性化される際に、G-CSF受容体の二量体化がみられることに鑑み、遺伝子工学的手法を用いて工夫したG-CSF受容体の二量体化により、造血幹細胞を増殖させるシステムを想到した。また、エストロゲン刺激によりエストロゲン受容体が二量体化するという事に鑑み、G-CSF受容体遺伝子とエストロゲン受容体遺伝子のキメラ遺伝子を作製し、そのキメラ遺伝子を導入した細胞に対して外部からエストロゲン刺激を与えることにより、強制的にキメラ遺伝子産物中のG-CSF受容体部分を二量体化させることを想到した。

【0007】

即ち、本発明者らは、外部からのエストロゲン刺激により、キメラ遺伝子産物中のG-C-S-F受容体部分の活性化を引き起こし、遺伝子を導入した造血幹細胞を選択的に増殖させるシステムを新規に開発し、これを遺伝子治療の分野に応用すべく本発明を完成した。

【0008】

即ち、本発明は、リガンドが結合する領域、該領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質、該融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む細胞及びステロイドホルモンを作用させることにより該細胞を体内ないし体

外で選択的に増殖させる方法等に関する。また、本発明は、該ベクターが外来遺伝子を含む場合は、該外来遺伝子が導入された細胞を選択的に増殖させる方法等に関する。

【0009】

本発明は具体的には、

- (1) (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、を含む融合タンパク質、
- (2) 「サイトカイン受容体又はその一部からなり、会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」が、G-C S F受容体に由来する、(1) 記載の融合タンパク質、
- (3) 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、(1) 記載の融合タンパク質、
- (4) ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である、(3) 記載の融合タンパク質、
- (5) (1) 記載の融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクター、
- (6) (5) 記載のベクターを保持する細胞、
- (7) (6) 記載の細胞に対して、(1) 記載の融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、(6) 記載の細胞を選択的に増殖させる方法、
- (8) (a) リガンドが結合する領域、(b) (a) の領域にリガンドが結合すると会合する領域、及び(c) 会合すると細胞に増殖活性を付与する領域、とを含む融合タンパク質をコードする遺伝子と所望の外来遺伝子、を含むベクター、
- (9) 「会合すると細胞に増殖活性を付与する領域」がサイトカイン受容体に由来する、(8) 記載のベクター、
- (10) サイトカイン受容体がG-C S F受容体である(9) 記載のベクター、
- (11) 「リガンドが結合する領域」がステロイドホルモン受容体に由来する、(8) 記載のベクター、
- (12) ステロイドホルモン受容体がエストロゲン受容体である(11) 記載の



ベクター、

(13) 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが同一の分子上に位置している(8)記載のベクター、

(14) 「融合タンパク質をコードする遺伝子」と「外来遺伝子」とが別々の分子上に位置している(8)記載のベクター、

(15) (8)～(14)のいずれかに記載のベクターを保持する細胞、

(16) (15)記載の細胞に対して、(8)記載のベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンドを作用させて、(15)に記載の細胞を選択的に増殖させる方法、

(17) (a) (5)または(8)に記載のベクター、及び(b)該ベクターに含まれる遺伝子がコードする融合タンパク質の「リガンドが結合するドメイン」に作用するリガンド、を含むキット、

に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明に用いられるリガンドは、特定のタンパク質に作用することにより該タンパク質を会合せしめるものであれば、特に制限はないが、ステロイドホルモンが好適である。ステロイドホルモンとしては、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイドなどが挙げられ、それぞれの受容体タンパク質との組み合わせで用いられる。また、本発明に用いられるサイトカイン受容体は、会合することによって細胞に増殖活性を付与するものであればよく、G-CSFなどサイトカイン受容体ファミリーに属するものや、c-kitやflk2/flt3などのようにチロシンキナーゼ受容体ファミリーに属するもの等がある。

【0011】

本発明の融合タンパク質における「細胞に増殖活性を付与する領域」としては、細胞内増殖シグナルを伝える分子、例えば、サイトカイン受容体分子全体を用いることが可能であるが、分子中の細胞に増殖活性を付与する領域のみを用いることも可能である。この場合、融合タンパク質遺伝子が導入された細胞の分化を

起こさず増殖のみを起こすので、該細胞をそのままの形で増殖させる際に有利である。さらに、本発明において用いられるベクターには、融合タンパク質をコードする遺伝子を含む単一種分子のベクター、融合タンパク質と外来遺伝子の双方を含む単一種分子のベクターの他、融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクターと外来遺伝子を含むベクターの組み合わせからなる複数種の分子からなるベクター系、例えば、バイナリーベクター系も含まれる。この複数種の分子からなるベクター系は通常、共形質転換 (co-transformation) によって細胞に導入される。

【0012】

なお、融合タンパク質をコードする遺伝子と外来遺伝子とを同一のベクターに挿入する場合には、IRES (internal ribosome entry site) (特表平6-509713号公報) を含むジシストロニックの形にすることができる。例えば、「5'-プロモーター-外来遺伝子-IRES-融合タンパク質をコードする遺伝子-3'」の構成を有するベクター、又は、「5'-プロモーター-融合タンパク質をコードする遺伝子-IRES-外来遺伝子-3'」の構成を有するベクターを用いることができる。該融合タンパク質遺伝子を発現している細胞のほぼ全てが外来遺伝子を発現しているようにするには、前者の形が一般に用いられる。

【0013】

また、本発明において、ベクターの導入される細胞としては、造血幹細胞、リンパ系細胞、これら血球系以外の細胞などが挙げられる。特に、本発明は、自己複製能を有する造血幹細胞に好適に適用される。なお、本発明において細胞に導入される外来遺伝子については、特に制限はないが、遺伝子治療の分野においては、欠陥遺伝子に対応する正常な遺伝子を用いるのが有効である。

【0014】

【実施例】

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0015】

[実施例1] 選択的増幅遺伝子であるG-CSF受容体/エストロゲン受容

### 体キメラ遺伝子の作製

G-CSF受容体全体とエストロゲン受容体のリガンド（エストロゲン）結合領域のキメラタンパク質（以下、単に「GCRER」と称する）が産生されるように、それぞれのタンパク質をコードするcDNAの融合遺伝子を作製した（図1(A)）。次いで、G-CSFに対する反応性を欠いたキメラタンパク質を産生するために、GCRERに対応する融合遺伝子のうちG-CSF受容体の細胞外ドメインの5番目のGluから195番目のLeuまでの部分を除いた変異誘導体（以下、単に「GCRΔ(5-195)/ER」と称する）を作製した（図1(B)）。さらに該変異誘導体から、G-CSF受容体の分化誘導ドメイン(725~756)を含んだ部分を除いた変異誘導体（以下、単に「GCRΔ(5-195,725-756)/ER」と称する）を作製した（図1(C)）。

【0016】

〔実施例2〕 選択的増幅遺伝子であるG-CSF受容体/エストロゲン受容体キメラ遺伝子が導入されたBa/F3細胞の単離

実施例1で作製した3種類の選択的増幅遺伝子をプラスミドpCMXに組み込んで作成したプラスミド10μgを、ScaIにて直線化したブラストサイジン耐性遺伝子を有するpSSRα bsr 1μgとともに、IL-3依存性細胞株であるBa/F3細胞に電気穿孔法にて導入した。次いで、電気穿孔施行後の細胞を $5 \times 10^5$ 個ずつ24ウェルプレートに分配し、ブラストサイジン10μg/mlを含む培地で培養した。この結果、pCMX-GCRERを導入した場合は、17ウェル中11ウェルで、pCMX-GCRΔ(5-195)/ERの場合は、29ウェル中3ウェルで、pCMX-GCRΔ(5-195,725-756)/ERでは、52ウェル中52ウェルで、ブラストサイジン耐性の細胞増殖がみられた。次いで、これらブラストサイジン耐性の細胞をウェルごとにIL-3で増殖させた後、IL-3の代わりにエストラジオール $10^{-7}$ Mを加えて培養を行ったところ、pCMX-GCRERを導入した場合は、11ウェル中7ウェルで、pCMX-GCRΔ(5-195)/ERの場合は、3ウェル中3ウェルで、pCMX-GCRΔ(5-195,725-756)/ERの場合は、16ウェル中13ウェルで、IL-3非依存性・エストロゲン依存性の細胞増殖がみられた。なお、pCMX-GCRERの代わりにレトロウイルスベクターであるpMXにGCRERを挿入したもの（以下、単に「pMX-GCRER」と称する）（図2）を用いて同様の実験を行ったところ、各1細胞を含む24ウェル中2ウェルで、IL-3非依存性・エストロゲン依存性の細胞増殖がみられた。

。また、pCMX-GCRERを導入した細胞に対し、エストラジオールに代えて、1nMのG-CSFを加えたところ、G-CSFで増殖のあるウェルは、エストラジオールで増殖のあるウェルと一致した。さらに、プラスミド未導入のBa/F3細胞をコントロールとして用いたところ、G-CSF及びエストラジオールによる増殖は認められなかった。なお、目的の融合タンパク質が細胞内で生産されていることは、抗G-CSF受容体抗体又は抗エストロゲン受容体抗体を用いたウエスタンブロッティング法により確認された。

【0017】

【実施例3】 エストラジオールによる細胞増殖の解析

実施例2で限界希釈法にて得たクローンのうち、エストラジオールに対する反応性の良いものを選択し、以下の実験（XTTアッセイ）に用いた。

【0018】

まず、pCMX-GCRERを導入したBa/F3細胞にて検討をおこなった。この結果、G-CSF及びエストラジオール刺激にて、IL-3非依存性の細胞増殖が認められた（図3）。さらに、エストラジオール濃度を $10^{-14}$ ～ $10^{-7}$ Mの間で変化させて同様の実験を行ったところ、 $10^{-9}$ ～ $10^{-7}$ Mの間で細胞増殖が認められた（図4）。これにより、 $10^{-9}$ ～ $10^{-7}$ Mの間の濃度によるエストラジオール刺激により、細胞増殖シグナルが伝達されることが示唆された。

【0019】

次いで、pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ERを導入したBa/F3細胞にて検討をおこなった。この結果、G-CSF刺激による細胞増殖はブロックされ、エストラジオール刺激によってのみ細胞増殖が認められた（図5）。

【0020】

同様に、pCMX-GR $\Delta$ (5-195,725-756)/ERを導入したBa/F3細胞でも、エストロゲン刺激で細胞増殖が起こり、G-CSFに対する反応性は認められなかった。

【0021】

【発明の効果】

本発明によって、外来遺伝子を導入した細胞を、外部刺激により選択的に増幅させることが可能となり、標的細胞への遺伝子の導入効率などが低い場合であっ

ても、有効な遺伝子治療が行えるようになった。また、本発明における細胞の選択的増幅システムは、様々な血液細胞に適用が可能であるため、遺伝子治療の対象となる細胞の範囲の拡大が図られた。従って、本発明によって、特に遺伝子治療の分野において重要な基盤技術が提供された。

【図面の簡単な説明】

【図1】

(A)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子（GCRER）を示す。(B)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子のうち、G-CSF受容体の5番目から195番目のアミノ酸が欠失した変異体（GCR $\Delta$ (5-195)/ER）を示す。(C)は、G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ分子のうち、G-CSF受容体の5番目から195番目及び725番目から756番目のアミノ酸が欠失した変異体（GCR $\Delta$ (5-195,725-756)/ER）を示す。

【図2】

G-CSF受容体とエストロゲン受容体のキメラ遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター-pMXを示す図である。

【図3】

pCMX-GCRERを用いて形質転換したBa/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

【図4】

pCMX-GCRERを用いて形質転換したBa/F3細胞に対し、様々な濃度のエストロジオール刺激を与えた後の、Ba/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

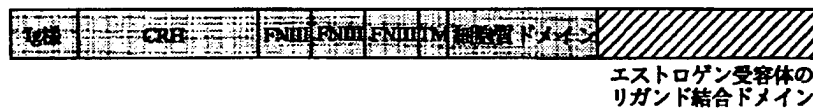
【図5】

pCMX-GCR $\Delta$ (5-195)/ERを用いて形質転換したBa/F3細胞の増殖を経時的に示す図である。

【書類名】 図面

【図1】

(A)



(B)

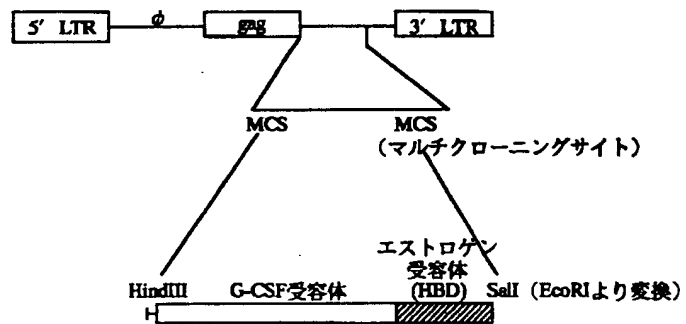


(C)

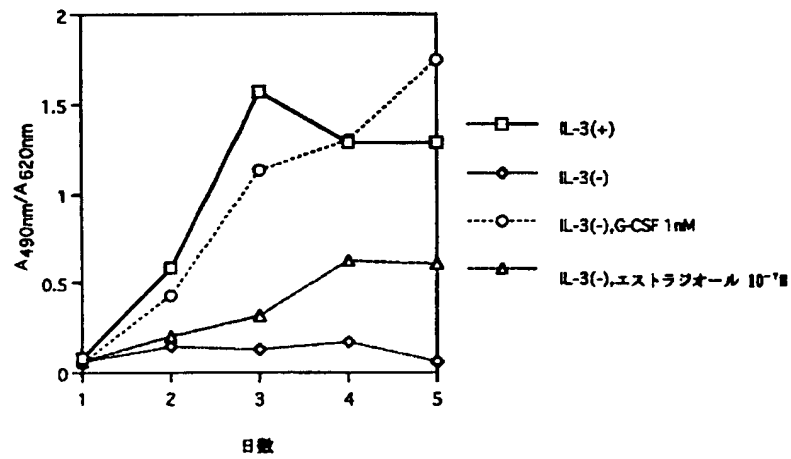


【図2】

レトロウイルスベクター (pMX)

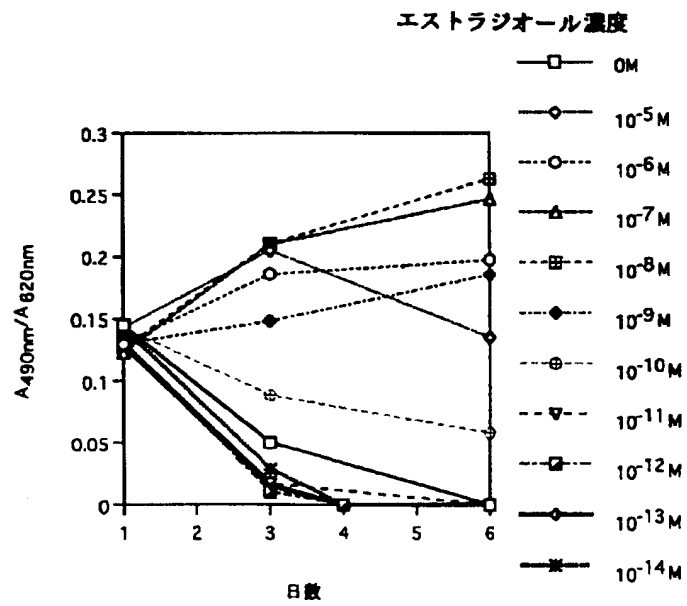


【図3】





【図4】



特平 8-047796

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 595155107  
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号  
【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

【代理人】

申請人  
【識別番号】 100102978  
【住所又は居所】 茨城県つくば市千現2-1-6 つくば研究支援セ  
ンターCA-4  
【氏名又は名称】 清水 初志

特平 8-047796

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595155107]

1. 変更年月日 1995年11月 1日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

氏 名 株式会社ディナバック研究所